

¿Estaba Christian Anfinsen en lo cierto?

Álvaro Martínez del Pozo

Resumen: Hace aproximadamente 50 años Christian B. Anfinsen llevaba a cabo una serie de experimentos que resultaron ser contribuciones esenciales para la comprensión del fenómeno del plegamiento de proteínas. Los resultados obtenidos le permitieron proponer lo que ha terminado por conocerse como la Hipótesis de Anfinsen. Durante este tiempo la Biología se ha transformado radicalmente por la revolución que ha supuesto el desarrollo de la Biología Molecular. En el presente artículo se reflexiona sobre la propuesta de Anfinsen y se cuestiona su actual validez.

Palabras clave: Anfinsen, plegamiento de proteínas, biosíntesis de proteínas, ribosoma

Abstract: Approximately 50 years ago Christian B. Anfinsen performed a series of experiments which represented seminal contributions to the understanding of the protein folding phenomenon. The results obtained allowed a proposal what has become to be known as the Anfinsen's Hypothesis. After all this time, Biology has been dramatically transformed by the development of the Molecular Biology revolution. This article is a reflection about Anfinsen's proposal as well as a challenge about its present validity.

Keywords: Anfinsen, protein folding, protein biosynthesis, ribosome.

Introducción

Se cumplen 50 años de los experimentos, ya clásicos, que Christian B. Anfinsen (1916-1995) realizó sobre el fenómeno del plegamiento de las proteínas y que le permitieron formular uno de los dogmas de la química de proteínas: “*Toda la información necesaria para el correcto plegamiento de una proteína se encuentra codificada en su secuencia de aminoácidos*”. Es por ello un buen momento para hacer una reflexión acerca del papel de la Biología, molecular o no, en el desarrollo científico del siglo XXI.

¿Qué es la biología?

El siglo XIX fue el siglo de la Química. Tras la revolución iniciada en el XVII por Lavoisier, continuada después por muchos otros ilustres químicos como Berzelius, Kekulé, Dalton, Von Liebig o Fischer, la Química dejó de ser alquimia. Por otra parte, es suficiente citar a Newton para admitir que la Física ya había adquirido un estatus de ciencia real mucho antes de iniciarse el siglo XX. Pero también es indudable que la revolución conceptual propiciada por Einstein y los demás físicos de partículas transformó la concepción de la realidad. Este auténtico cambio de paradigma fue tan radical que tampoco caben dudas al denominar al siglo XX como el de la Física.

Cuando se escriben estas líneas casi finaliza ya la primera década del siglo XXI. Un siglo que promete ser el de la Biología, ya que, a pesar de que durante la segunda mitad del siglo XX también se asistió al espectacular desarrollo de la Biología Molecular, todavía es necesario un tremendo esfuerzo para construir un cuerpo de doctrina unificado que la consolide definitivamente al mismo nivel que sus disciplinas hermanas, la Física y la Química.

Por este motivo, es obligado que en esta reflexión se empiece por preguntar: ¿*Qué es la Biología?* Y es legítimo contestar recurriendo a los clásicos, como Ernst Mayr (1904-2005), ilustre biólogo y filósofo de la ciencia, que vivió más de 100 años. Es decir, asistió en directo no sólo a la revolución

conceptual que tuvo lugar en la Biología, sino también a los acontecimientos que la precedieron y la continuaron. En una de sus últimas obras, titulada *Por qué es única la biología*^[1], recapitula sobre toda su labor y da una serie de pautas a seguir. En sus propias palabras, la BIOLOGÍA estaría compuesta por dos campos claramente diferenciados: la *mecanicista* o *funcional* y la *histórica*. La *Biología funcional* trataría de la fisiología de las actividades de todos los seres vivos, en especial de los procesos celulares, que pueden explicarse de forma mecanicista, recurriendo a la Física y la Química. No se necesita conocer historia para explicar un proceso funcional. Este conocimiento resulta indispensable, sin embargo, para la explicación de los aspectos que implican la dimensión del tiempo histórico, incluidos los aspectos evolutivos. Ésta sería la *Biología histórica*. Las diferencias se extienden también a la naturaleza de las preguntas que se hacen con más frecuencia. En ambos casos se plantea “¿cuáles?” son los hechos necesarios para continuar con el análisis pero, mientras que en la *Biología histórica* la pregunta más frecuente sería “¿por qué?”, en la *funcional* lo que normalmente se plantea es “¿cómo?”. Por ejemplo, ¿por qué hubo simios que adoptaron un sistema de marcha bípeda? o ¿por qué apareció la reproducción sexual?, frente a ¿cómo puede un simio adoptar un sistema de marcha bípeda? o ¿cómo tiene lugar la reproducción sexual?.

El Dogma

Los biólogos moleculares normalmente se ocupan de responder a las preguntas que plantea la *Biología funcional*. Se trata de explicar cómo las funciones biológicas son desarrolladas por sistemas o estructuras que han evolucionado precisamente para desarrollarlas. Existe una estrecha relación entre la estructura y la función. Por ejemplo, si se plantea contestar a la pregunta de cómo vuelan las aves, inmediatamente se concluirá que existe una inequívoca relación entre la función, volar, y la estructura responsable, las alas. *Las alas son para volar*. En último término, cuando se consigue determinar cuál es realmente esa relación, se puede aprovechar en nuestro beneficio. Sin ir más

lejos, copiar las alas nos ha permitido a los seres humanos ejercer la función de volar.

Este planteamiento, que a nivel macroscópico resulta incluso simplista, también se mantiene a nivel molecular. Y es esta estrategia la que llevó a Anfinsen a realizar los experimentos que en 1972 le supondrían la obtención del Premio Nobel por “*su trabajo con la ribonucleasa, especialmente aquél concerniente a la conexión existente entre su secuencia de aminoácidos y su conformación biológicamente activa*”. El fruto de este trabajo le permitió formular además uno de los principios de la entonces naciente Biología Molecular: “*A cada cadena polipeptídica le corresponde una conformación concreta única y, además, toda la información necesaria para adoptarla está contenida en su secuencia de aminoácidos*”. Afirmación que yo me atrevo a rebautizar como *el Dogma universal del plegamiento de proteínas*. Cincuenta años más tarde, lo que se plantea aquí es si todavía hoy sigue siendo válido.

El establecimiento del *Dogma*

A finales de los años 50 se puso de moda trabajar con la ribonucleasa pancreática bovina (*RNasa A*), una proteína cuyo estudio supuso grandes avances científicos, algunos premiados con el Premio Nobel (Tabla 1). Se trata de una enzima cuya actividad resulta fácil de medir; actividad que se puede utilizar como señal del mantenimiento de su función biológica y, consecuentemente, de su estructura nativa. Es una proteína relativamente pequeña, y muy estable. Y, por último, su utilización coincidió con que una compañía americana de envasado de carne purificó 1 kg a homogeneidad, dedicándose a regalarla en generosas porciones. En definitiva, la *RNasa A* era una proteína abundante y fácil de manejar.

Tabla 1. Relación de Premios Nobel concedidos a científicos cuyo trabajo implicó el estudio de diferentes ribonucleasas.

Galardonado	Año de concesión	Ribonucleasa	Descubrimiento
John H. Northrop	1946	Ribonucleasa A	Cristalización
Archer J.P. Martin	1952	Ribonucleasa A	Separación cromatográfica
Christian B. Anfinsen	1972	Ribonucleasa A	Plegamiento
William H. Stein	1972	Ribonucleasa A	Secuenciación
Stanford Moore	1972	Ribonucleasa A	Secuenciación
Howard M. Temin	1975	Ribonucleasa H	Transcripción inversa
David Baltimore	1975	Ribonucleasa H	Transcripción inversa
Bruce Merrifield	1984	Ribonucleasa A	Síntesis química
Sidney Altman	1989	Ribonucleasa P	Ribozimas
Andrew Z. Fire	2006	Dicer	Interferencia por RNA
Craig C. Mello	2006	Dicer	Interferencia por RNA

El conjunto de experimentos realizado por Anfinsen consistió en demostrar que esta *RNasa A*

aislada se podía desnaturalizar y renaturalizar de manera reversible^[2-5]. La existencia de tres puentes disulfuro en la proteína nativa permitía, además, desnaturalizarla en presencia, o no, de agentes reductores. La retirada de estas condiciones manteniendo un ambiente reductor conducía a un estado enzimáticamente inactivo. Por el contrario, la renaturalización en condiciones oxidantes conllevaba la desaparición de los grupos tiol libres y la recuperación de la actividad ribonucleolítica y, por tanto, de la estructura nativa (Figura 1). Estos resultados demostraban que la *RNasa A* era capaz de adoptar su estructura nativa desde un estado completamente desnaturalizado y que toda la información necesaria para ello debía estar encriptada en su secuencia de aminoácidos. La observación de que se formaba el emparejamiento adecuado de los grupos sulfhidrido no era baladí, dado que con los 8 SH que contiene existen más de 100 posibilidades de emparejamiento distintas y sólo una de ellas es la correcta.

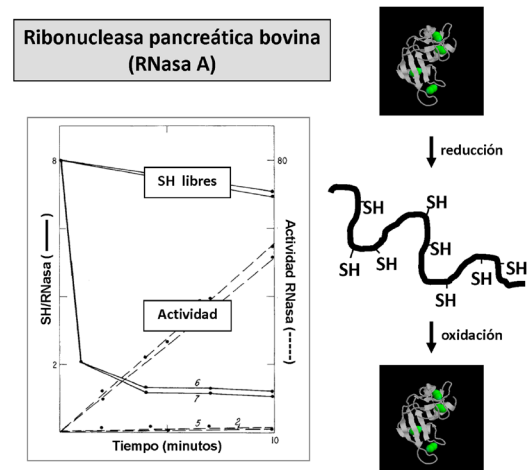


Figura 1: Representación esquemática de los experimentos de desnaturalización-renaturalización llevados a cabo por Anfinsen, en distintas condiciones de óxido reducción^[2-5].

El segundo grupo de experimentos que llevaron a la consolidación del *Dogma* fueron realizados por Frederick Richards (1925-2009), extraordinario químico de proteínas y gran navegante. En 1957 demostró que un tratamiento suave de la *RNasa A* con subtilisina rendía dos únicos fragmentos de distinto tamaño, que fue capaz de separar, aislar y caracterizar^[6,7]. Al mayor de ellos lo denominó *RNasa S* mientras que utilizó la denominación de *Péptido S* para referirse al menor (Figura 2). Además, fue capaz de demostrar que ambos fragmentos por separado carecían de actividad, pero que ésta se recuperaba si se mezclaban en cantidades equimoleculares; sin que se restableciese el enlace peptídico previamente degradado. Estos descubrimientos, por tanto, no sólo reforzaron la hipótesis aún no formulada de Anfinsen, sino que demostraron que en una proteína podían existir dominios estructurales capaces de plegarse de forma individual. Es decir, el *plegamiento* puede tener lugar de forma *modular*. La trascendencia de los trabajos de Richards, y su anticipación temporal, fueron tales que debió de haber compartido el Premio Nobel con Anfinsen, algo que nunca ocurrió.

El tercer hito científico realmente destacado tuvo lugar ya casi 20 años después, y se concretó en los experimentos llevados a cabo por el británico Thomas E. Creighton con el inhibidor pancreático bovino de la tripsina. Con un planteamiento muy parecido al de Anfinsen, pero en presencia de agentes químicos capaces de unirse a los grupos tiol, fue capaz de demostrar que durante el plegamiento del inhibidor se producían toda una serie de estados intermedios que se podían “atrapar”^[8]. Es decir, el camino que puede seguir una proteína desde su estado desplegado hasta alcanzar la estructura tridimensional nativa no es necesariamente único y comporta la aparición de intermedios. Esta demostración fue el detonante del comienzo de una intensa carrera, aún no acabada, hacia la comprensión de los mecanismos de plegamiento de las proteínas, y en la cual juegan un papel fundamental los métodos computacionales de predicción.

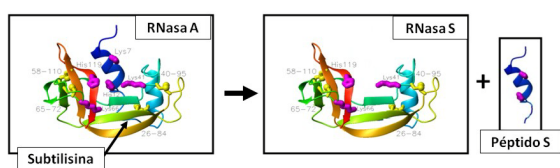


Figura 2: Representación esquemática de los experimentos que permitieron a Richards llevar a cabo el aislamiento y caracterización de la ribonucleasa S y de su correspondiente péptido S’^[6,7].

Durante los 15 años siguientes se fue acumulando una ingente cantidad de datos que siempre apuntaron a favor de la validez del *Dogma*. En 1994, G.D. Rose y T.P. Creamer plantearon el reto de diseñar dos proteínas con más de un 50% de identidad de secuencia que mostrasen un patrón de plegamiento completamente distinto. Esta propuesta, por la que ofrecían 1.000,00 \$ de premio, se denominó como el *Reto de Paracelso*^[9,10]. Sólo tres años más tarde este premio era entregado a Lynne Regan, por haber conseguido que una proteína cuyo plegamiento mayoritario era en forma de lámina β se transformase en otra mayoritariamente helicoidal al cambiar sólo 28 de sus 56 residuos^[11]. La nueva proteína artificial se denominó *Jano* (Figura 3), nombre que hace referencia al conocido dios mitológico romano.

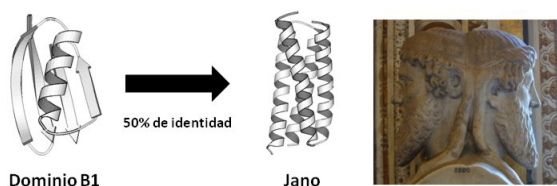


Figura 3: Esquema en el que se muestran las estructuras tridimensionales de la proteína artificial Jano y la del dominio B1 de la proteína de unión de inmunoglobulinas de *Streptococcus*^[11]. En la parte derecha de la figura se muestra también un detalle de una escultura en la que se representa al dios mitológico romano Jano.

En conjunto, todos estos resultados confirmarían inequívocamente la *Hipótesis de Anfinsen*, incluyendo nuevos aspectos^[12], que se podrían resumir en forma de los siguientes cuatro enunciados (Figura 4):

1.- La información necesaria para el correcto plegamiento de una proteína está contenida en su secuencia.

2.- Hay intermedios de plegamiento con una existencia lo suficientemente larga como para que se puedan aislar y caracterizar.

3.- El plegamiento es modular, discontinuo y jerárquico, siendo por ello muy importantes los aspectos cinéticos del proceso.

4.- La conformación nativa final es única para cada secuencia y entorno, aunque un determinado tipo de plegamiento no vaya siempre asociado al mismo tipo de función, y viceversa.

Descifrar el código de plegamiento de las proteínas, siendo capaces de predecir fiablemente su estructura tridimensional a partir de la secuencia de aminoácidos, es una de las grandes cuestiones a resolver durante el siglo XXI y una de las claves necesarias para que la Biología alcance el estatus al cual se hace referencia al comienzo de estas líneas.

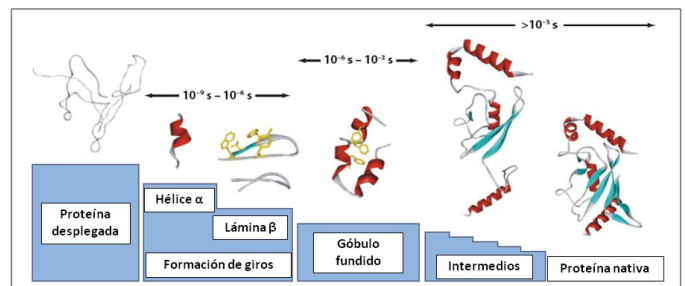


Figura 4: Resumen (adaptado de la referencia^[12]) de los conceptos generales que actualmente se aceptan como válidos a la hora de explicar el fenómeno del plegamiento de proteínas.

El cuestionamiento del *Dogma*

En las células las proteínas no están aisladas. Más bien al contrario. Se encuentran en presencia de una concentración brutal de macromoléculas que alcanza, por ejemplo, niveles de hasta 400 mg/mL en el citosol de *E. coli*. Se habla de una auténtica “muchedumbre macromolecular”. Entre estas estructuras destacan los ribosomas, no sólo por su presencia en gran número (suponen hasta el 30% del total de la masa celular) sino porque constituyen la localización donde tiene lugar la síntesis de proteínas. Simultáneamente con su síntesis por parte del ribosoma, los polipéptidos nacientes son además sometidos a procesamientos enzimáticos y plegamiento asistido por chaperonas. Por último, se dirigen hacia distintas localizaciones donde, a su vez, son translocados a través de, o insertados en, diferentes membranas. El propio ribosoma desempeña un papel importante en todas estas tareas y gobierna la interacción que se establece entre todos los factores implicados.

Todo ello es relevante porque el plegamiento de las proteínas *in vivo* no tiene lugar cuando éstas están ya completas, sino que comienza a la salida del ribosoma, mucho antes de que haya finalizado su síntesis. Es decir, cuando las proteínas se pliegan en el seno de las células *no están solas, ni completas*. Ambos aspectos introducen una serie de matices que no se pueden despreciar a la hora de valorar la vigencia de la hipótesis de Anfinsen y permiten encontrar en la Naturaleza algún caso que contradice el *Dogma*: *una misma secuencia si puede adoptar dos conformaciones distintas*. Este artículo se centra en aquellos ejemplos

cuya existencia se basa en el carácter degenerado del código genético.

El código genético es degenerado.

Los 20 aminoácidos proteicos no se corresponden con sólo 20 codones distintos, sino con 61. Por este motivo, todos ellos, salvo Met y Trp, pueden ser codificados por más de un triplete. La existencia de *codones sinónimos* es la que ha motivado que se hable de que *el código genético es degenerado*. Esta redundancia se traduce en que una proteína de 300 aminoácidos, por ejemplo, podría ser codificada hasta de 10^{151} formas distintas. ¿Por qué se utiliza entonces una única secuencia de DNA para cada proteína concreta? Los genes conocidos presentan un claro sesgo, que depende de cada especie, y que se traduce en que para cada aminoácido unos codones son mucho más utilizados que otros^[13]. Estos *tripletes sinónimos* son además leídos por diferentes moléculas de RNA de transferencia (tRNA) *isoceptoras* (moléculas distintas que cargan el mismo aminoácido y reconocen codones diferentes). Al menos en *E. coli*, los genes que se expresan en abundancia muestran una marcada tendencia hacia la utilización de codones correspondientes a los tRNAs más abundantes. Por este motivo, la degeneración del código genético permite un potencial adicional para que el RNA mensajero (mRNA) sea portador de una información extra, más allá de la codificación de su secuencia, con respecto a la proteína sintetizada en cada caso^[13,14].

¿Hay proteínas que no respetan el Dogma?

Cuando cambia un nucleótido en un gen, sin alterar la naturaleza del aminoácido codificado, se habla de *sinónimo de nucleótido único* (SNP). Puesto que un SNP no produce una secuencia codificante alterada, no es esperable que tenga lugar ningún cambio en la proteína sintetizada. Sin embargo, ya se han descrito ejemplos en los que sí se produce un cambio de funcionalidad asociado a SNPs, sin que se altere la secuencia polipeptídica^[14-16].

El primero de estos ejemplos hace referencia al virus de la polio^[15,17]. Si de forma artificial se incorporan un gran número de codones sinónimos de uso poco frecuente al DNA codificante de la proteína que constituye su cápsida, se obtienen virus en los que la secuencia de sus proteínas tiene que seguir siendo idéntica a los de los virus naturales. Sin embargo, sorprendentemente, cuando se llevó a cabo este experimento, los virus que se produjeron se comportaron como atenuados cuando se utilizaron para infectar ratones^[15]. La atenuación observada se atribuyó a una disminución de la velocidad de traducción de la proteína de la cápsida, motivada precisamente por la presencia de los codones raros. La hipótesis de trabajo sería que una alteración en la velocidad de síntesis de una proteína repercute necesariamente sobre su cinética de plegamiento, posibilitando la adopción de conformaciones alternativas (Figura 5).

Más llamativo, si cabe, es el segundo ejemplo. El producto del gen MDR1, la *glicoproteína P*, es responsable de la resistencia multifármaco desarrollada por muchas células cancerosas. La introducción de una única SNP que incorpora un codón poco frecuente produce una proteína que tiene alterada su capacidad para interaccionar con fármacos^[16], sin que disminuyan ni los niveles de mRNA, ni los de proteína producida, indicando que tiene que ser la conformación la que está alterada. Algo que se demostró mediante una digestión parcial con tripsina. Todo ello sin que hubiese cambios en su secuencia de aminoácidos. Los autores de este trabajo también proponen que la presencia del codón raro afectaría a la cinética del plegamiento cotraduccional de la proteína y a su subsiguiente integración en la membrana.

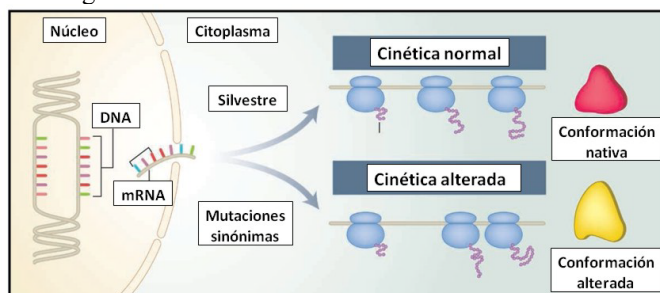


Figura 5: Esquema adaptado de la referencia^[14] en el que se ilustra cómo la introducción de mutaciones sinónimas que impliquen un aumento del número de codones poco frecuentes puede repercutir en la cinética del proceso de biosíntesis de proteínas, resultando en una conformación final alterada.

Pero, ¿es realmente posible que una SNP afecte a la cinética de la traducción? ¿La diferente disponibilidad de los distintos tRNAs isoceptores podría afectar a la velocidad de biosíntesis proteica y, de este modo, modificar la cinética de plegamiento?

La biosíntesis de proteínas

La velocidad a la que es traducida una región del mRNA depende de varios parámetros como la propia frecuencia de uso de codones, las interacciones codon-anticodon y la estructura secundaria de las regiones del RNA involucradas. La concentración de tRNAs isoceptores puede ser muy distinta; a veces de hasta diez veces, y varía, no sólo de unos seres vivos a otros, sino también dentro de las diferentes etapas de desarrollo de un mismo organismo. Esta distribución asimétrica de los tRNAs puede provocar diferencias en la velocidad de traducción de cada codón particular, siendo máxima para aquellos codones cuyas moléculas de tRNA correspondientes sean abundantes^[18,19]. Un cambio en la disponibilidad de los tRNAs afectaría a la velocidad de la traducción y este efecto cinético (Figuras 4 y 5) implicaría que la proteína, que empieza a plegarse antes de estar completamente sintetizada, pudiese adoptar una conformación distinta, no nativa^[14,15,17-19].

Los ribosomas son partículas formadas por dos subunidades principales de naturaleza ribonucleoproteica, que se asocian para descodificar la información genética encriptada en el mRNA y traducirla en forma de cadenas polipeptídicas^[20]. Este

es un proceso extraordinariamente eficiente, de alta fidelidad y, por ello, finamente regulado (Figura 6).

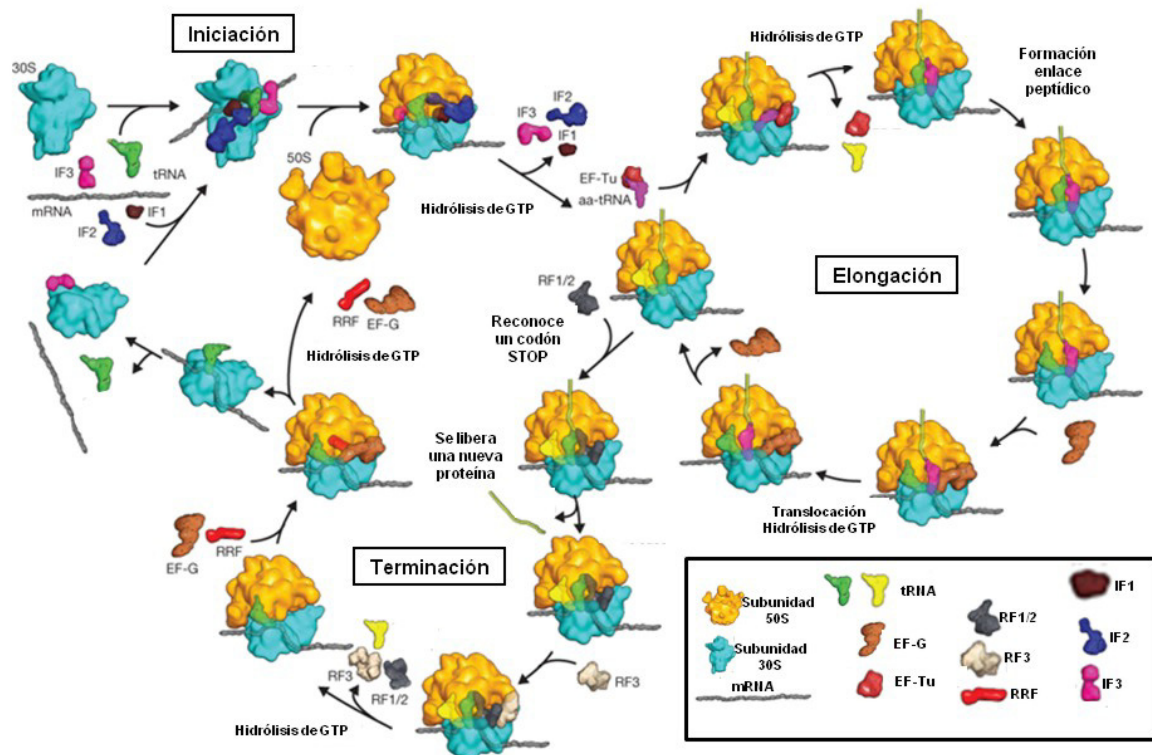


Figura 6: Representación esquemática del proceso de biosíntesis de proteínas en *E. coli*. Figura adaptada de la referencia^[20].

En células en crecimiento la mayoría de los ribosomas se encuentran activos y sintetizan las proteínas muy rápidamente, a una velocidad de unos 20 aminoácidos por segundo en bacterias y de 5 a 9 en células eucariotas. Además, un mismo transcrito de mRNA puede ser traducido simultáneamente por varios ribosomas, asociación que se denomina *polisoma*.

La biosíntesis de proteínas en procariotas tiene lugar como se muestra en la Figura 6. En una primera fase, dos *factores de iniciación*, IF-1 e IF-3, se unen a la subunidad menor del ribosoma, impidiendo una unión prematura, “no productiva”, de la subunidad mayor. Seguidamente, a través de interacciones con su RNA ribosómico (rRNA) 16S, la subunidad menor reconoce la secuencia de *Shine-Dalgarno* de un mRNA, al que se une de forma que el codón de iniciación quede convenientemente colocado en una localización que se denomina como *sitio P*. Entonces un tercer factor (IF-2) recluta el correspondiente aminoacil-tRNA (aa-tRNA), que en este caso es el correspondiente a la formil-metionina, y es capaz de colocarlo convenientemente apareado al codón de iniciación. Valiéndose de la energía suministrada por la hidrólisis por parte de IF-2 de una molécula de GTP, los factores de iniciación se disocian y abandonan el complejo ribosomal. Es entonces cuando se incorpora la subunidad mayor, quedando completamente ensamblado el ribosoma.

La siguiente fase es la de *elongación*, que se divide a su vez en tres etapas principales: incorporación del siguiente aa-tRNA, formación de un nuevo enlace peptídico y translocación para empezar un nuevo ciclo de elongación. Durante la primera etapa, la *posición A* vacía, correspondiente al siguiente codón al de

iniciación, es ocupada por el correspondiente aa-tRNA, que es acompañado por otra GTPasa, el factor de elongación TU (EF-Tu), cuya participación es necesaria para su rápida colocación en la posición correcta. Esta asociación aa-tRNA:EF-Tu:GTP se conoce como *complejo ternario de iniciación*. Entonces se forma el enlace peptídico entre los dos aa-tRNA contiguos, una reacción que es catalizada por el rRNA, de forma que el ribosoma se comporta como una auténtica ribozima. Finalmente, tiene lugar la *translocación*. Mediante un mecanismo de rueda de trinquete, el ribosoma se desplaza sobre el mRNA de forma que el tRNA que ya no está aminoacilado pasa a ocupar una nueva *posición*, denominada *E*, mientras que aquél que contiene el dipéptido inicial pasa a la *P*, dejando el sitio *A* nuevamente vacío, listo para aceptar un nuevo aa-tRNA e iniciar un nuevo ciclo de elongación. Todo este proceso se ve facilitado por la participación de una nueva GTPasa, el factor EF-G (Figura 6).

La elongación de la cadena polipeptídica tiene lugar tantas veces como sea necesario, en función del número de aminoácidos que tenga la proteína, hasta alcanzarse un codón de terminación. Evidentemente, la eficacia de este proceso de elongación y, por tanto, la velocidad global con que tiene lugar, pueden verse alteradas por la diferente disponibilidad de los distintos tRNAs. Ésta sería la etapa más directamente afectada por la introducción de codones poco frecuentes mediante mutaciones sinónimas.

Una vez que el ribosoma se topa con un codón de parada, tiene lugar la fase de *terminación* de la traducción. Los codones de terminación no son reconocidos por ningún tRNA complementario sino,

una vez más, por factores proteicos que, en el caso de los procariotas, se denominan *factores de liberación* RF. Estos factores poseen una conformación que mimetiza la estructura tridimensional de los tRNA lo que les permite unirse al sitio A del ribosoma. Al unirse cualquiera de ellos, se produce la hidrólisis del enlace que une la cadena polipeptídica naciente al tRNA en la posición P y se libera, ya completa, desensamblándose todo el complejo ribosomal. Un tercer factor, RF-3, también con actividad de GTPasa, participa acelerando esta disociación y desensamblaje (Figura 6).

Durante todo este proceso se va formando una cadena polipeptídica que tiene que ir acomodándose. Para ello la subunidad mayor del ribosoma posee un auténtico túnel (Figura 7) a través del cual se “desliza” esta cadena naciente hacia el exterior del ribosoma. De esta forma la cadena emerge por la boca de salida del túnel, empezando por su extremo amino-terminal^[21].

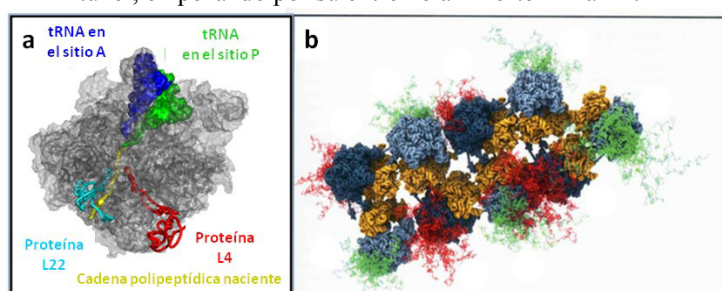


Figura 7: a) Representación en la que se aprecian dos moléculas de tRNA unidas a los sitios A y P del ribosoma, así como una cadena polipeptídica naciente, en color amarillo, atravesando el túnel ribosomal. Se trata de una adaptación de una figura que aparece en http://www.weizmann.ac.il/sb/faculty_pages/Yonath/00Sc_activities.html. b) Reconstrucción de la estructura de un polisoma a partir de micrografías electrónicas^[22]. La salida del túnel queda orientada hacia el exterior de la estructura helicoidal, permitiendo que las cadenas polipeptídicas nacientes, representadas en rojo y en verde, puedan acceder al exterior sin dificultad.

Este túnel recuerda realmente a un tubo. Puede acomodar una cadena polipeptídica de unos 30 aminoácidos, en una conformación extendida, o hasta 60 en forma de hélice. Mediante criotomografía electrónica^[22] se ha puesto de manifiesto que los polisomas se organizan en una estructura pseudohelicoidal, en la que la cara de los ribosomas que contiene la salida del túnel se encuentra orientada precisamente hacia el exterior (Figura 7). No es posible que tenga lugar el plegamiento completo de una cadena polipeptídica naciente dentro de las reducidas dimensiones del túnel. Sin embargo, sí es posible el de pequeñas unidades elementales. El túnel no es un entorno pasivo. Las interacciones que en él se establecen pueden promover la adopción de estructuras secundarias en las cadenas nacientes^[23], de forma que hay un mecanismo de retroregulación de la velocidad de traducción que puede producir pausas transitorias^[23,24].

Además, a la salida del túnel las cadenas se encuentran con proteínas diversas ya que el ribosoma sirve de plataforma para la asociación temporal y espacial de enzimas varias, factores de localización y chaperonas, que actúan sobre los polipéptidos nacientes nada más emerger del ribosoma^[25]. Todas estas proteínas ejercen su función o, al menos, mejoran su

eficiencia, uniéndose precisamente al ribosoma en las proximidades de la salida del túnel. Así, el plegamiento *in vivo* de las proteínas mientras todavía permanecen unidas al ribosoma puede estar favorecido no sólo por cambios en la cinética de la traducción sino también por interacciones con el propio ribosoma^[25,26].

En definitiva, hoy en día parece ya claro que el ribosoma puede intervenir en el plegamiento de las proteínas que sintetiza, no sólo modificando la cinética del proceso o su localización final, sino también limitando el espacio conformacional a explorar, actuando así como catalizador hacia el logro de su estructura nativa.

¿Sigue siendo válido el Dogma? ¿o no?

¿Puede entonces alterarse tanto la cinética de la traducción que acabe provocando que una misma secuencia de aminoácidos pueda adoptar una conformación distinta? Ya se ha mencionado cómo el plegamiento *in vitro* de una proteína completa y aislada tiene lugar de forma discontinua y jerarquizada (Figura 4), incluso cuando es capaz de plegarse correctamente sin la asistencia de ningún otro factor. Primeramente se adquieren los elementos de estructura secundaria que representan conformaciones ordenadas. Seguidamente, se ensamblan dando lugar progresivamente a intermedios de mayor complejidad, en cuanto a su grado de estructura terciaria. Finalmente, se adquiere la conformación tridimensional nativa^[12]. En esta situación, efectivamente, el proceso viene determinado únicamente por las características de la secuencia de la proteína considerada, como correctamente propuso Anfinsen.

Ya en 1987 se propuso que el plegamiento de algunas proteínas se podría ver afectado por la velocidad a la que sus cadenas polipeptídicas fuesen traducidas *in vivo*^[27]. Las secuencias de sus genes habrían evolucionado con el fin de controlar la velocidad de elongación de manera que la síntesis de porciones definidas de las cadenas polipeptídicas estuviese temporalmente separada. La existencia de este mecanismo de traducción discontinua podría facilitar el plegamiento de dominios distintos. En el transcriptoma completo de *E. coli*, por ejemplo, se observa que la presencia de segmentos que se predicen como de traducción lenta es fuertemente dependiente de la localización celular de las proteínas estudiadas. Estos segmentos son, además, mucho más frecuentes cuanto mayores son las proteínas estudiadas. Si el ensamblaje tiene lugar mediante etapas discretas, implicando a segmentos individuales, éste podría ser más favorable desde el punto de vista cinético. Cada unidad del plegamiento se iría estabilizando de forma secuencial, construyéndose el estado nativo de forma progresiva y evitándose así “trampas cinéticas”. Este plegamiento secuencial sería ventajoso ya que, al ser cinéticamente más favorable, es de esperar que fuese también más rápido. Evidentemente, estas velocidades de traducción se podrían ver afectadas por las pausas. Cuanto más largas fuesen estas pausas, más probable sería la aparición de un escenario de cinética de plegamiento alterada^[26] (Figura 5).

En este contexto, la presencia de los “codones raros” provocaría un “atasco” ribosomal que podría reforzar unas vías de plegamiento secuencial sobre otras, conduciendo a mínimos distintos del espacio de energía. Este aspecto es, por ello, sensiblemente distinto de la situación que tiene lugar cuando el estudio del plegamiento de proteínas se realiza *in vitro* (Figura 8).

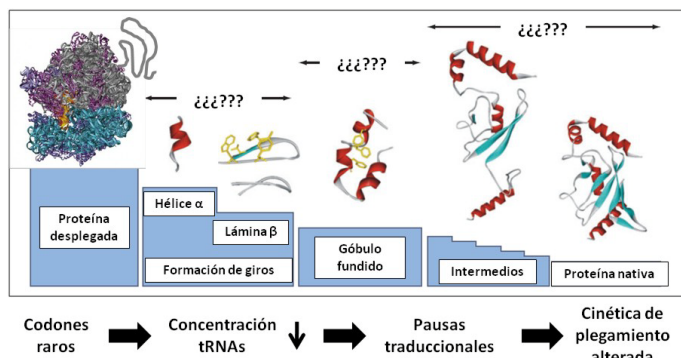


Figura 8: Esquema adaptado de la referencia^[12] que refleja cómo las pausas traduccionales provocadas por la abundancia de codones de uso poco frecuente podrían alterar el escenario de plegamiento de una proteína.

Los codones potencialmente traducidos a menor velocidad, los “poco frecuentes”, se encuentran además predominantemente en regiones que codifican péptidos de enlace entre distintos dominios estructurales de una misma proteína. Hasta tal punto que los perfiles de codones raros en el mRNA pueden servir para detectar o predecir la existencia de estos dominios proteicos^[28].

Finalmente, el examen de la conformación de los aminoácidos en el seno de una cadena polipeptídica revela una clara correlación entre la frecuencia de codones en el mRNA y las características topológicas de las proteínas codificadas. Las hélices α tienden a ser codificadas preferentemente por regiones de traducción rápida mientras que los segmentos lentos a menudo corresponden con las hebras β y las regiones no periódicas. Consecuentemente, las regiones helicoidales se traducen más rápido y los estudios cinéticos de plegamiento *in vitro*, realizados con proteínas desnaturalizadas aisladas, indican que también se pliegan más deprisa. En definitiva, todo parece indicar que la velocidad de traducción ha sido optimizada para estar a tono con la eficiencia del plegamiento cotraduccional^[27-29], si bien hasta aquí sólo se han presentado pruebas de carácter estadístico o circunstancial.

Los codones influyen en el plegamiento

Efectivamente, todos los aspectos comentados hasta el momento sobre la posibilidad de transgredir *el Dogma de Anfinsen* son esencialmente de carácter estadístico, circunstancial o predictivo. Para cuestionarlo realmente sería necesario disponer, al menos, de alguna verificación experimental. En la primavera del año 2009 se publicó un primer trabajo que sí podría ser ya una evidencia de que la conformación final de una proteína puede ser modulada por la presencia de

codones raros^[26]. El sistema experimental utilizado se centra en el estudio de la traducción *in vitro* de diferentes proteínas de *E. coli*, entre las que destaca, por los resultados obtenidos, *SufI*, una proteína multidominio de unos 350 aminoácidos y de función todavía desconocida, aunque sí se conoce su estructura tridimensional, en la que aparecen dominios estructurales bien diferenciados (Figura 9).

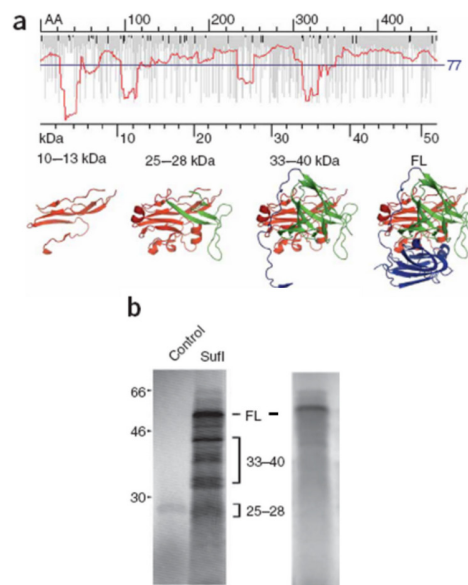


Figura 9: a) En la parte superior se muestra un análisis de la frecuencia de uso (línea roja) de los codones que aparecen en el mRNA responsable de la codificación de la proteína *SufI*. Debajo de ella, aparece la estructura tridimensional de la proteína completa y la de los distintos dominios estructurales que la componen. b) Foto de una autorradiografía en la que se han separado los productos de una traducción *in vitro* sincronizada realizada en ausencia de mRNA (control), en presencia del mRNA natural (*SufI*) o de una versión de éste en la que, mediante mutaciones sinónimas, se han eliminado todos los codones de uso poco frecuente. FL indica la posición correspondiente al tamaño de la proteína completa. Esta figura es una adaptación de otras que aparecen en^[26].

Cuando se analiza la secuencia del mRNA responsable de su codificación se observa que existen cuatro zonas en las que abundan las agrupaciones de codones raros (Figura 9a) y que efectivamente coinciden con los péptidos de enlace entre los distintos dominios. Si utilizando este mRNA natural se estudia el patrón de producción de *SufI* en un sistema de traducción libre de células sincronizado, se observa la aparición no sólo de *SufI* completa, sino también la de otros productos discretos de la traducción, de menor tamaño (Figura 9b), que coinciden precisamente con los dominios estructurales observados en la conformación nativa. Estos intermedios de traducción representan dominios de plegamiento pues son resistentes a la digestión parcial con proteinasa K. Observación que sugiere que ya han alcanzado su conformación nativa final, todavía unidos al ribosoma, sin que la biosíntesis de la cadena polipeptídica haya acabado. Es decir, los dominios de estructura tridimensional del polipéptido naciente se plegarían de forma secuencial, aunque no independiente, durante el proceso de la traducción, y la velocidad del proceso podría alterar esta dinámica. Cuando este mismo experimento se lleva a cabo utilizando como molde un mRNA artificial en el que su composición de codones

es tal que no se pueden producir “paradas” porque sólo hay codones frecuentes, únicamente se obtiene un producto, la proteína *SufI* completa, y no hay vestigios de los intermedios (Figura 9b).

En definitiva, este trabajo demuestra que la agrupación de codones de traducción lenta condiciona no sólo este proceso, sino también el del plegamiento de dominios estructurales independientes y que, por tanto, este efecto está modulado de forma jerárquica.

Conclusión: las excepciones son importantes en Biología

¿Cuál es entonces la respuesta final a la pregunta planteada en el título que encabeza este escrito? ¿Es todavía válida la *Hipótesis de Anfinsen*? No hay ninguna duda de que este *Dogma*, a día de hoy, se mantiene con plena validez y vigencia, especialmente cuando se aplica al plegamiento de proteínas aisladas. Pero también parece claro que se pueden encontrar excepciones a la regla. Excepciones que, precisamente, son muy frecuentes en Biología, en la que la individualidad juega un papel muy importante. Tanto que, muy probablemente, las excepciones constituyen una de las principales causas por las que todavía no ha alcanzado el mismo nivel de generalización doctrinal que la Física y la Química. Al fin y al cabo, retomando el ejemplo con el que se iniciaba esta disertación, es de sobra sabido que tener alas no es siempre suficiente para poder volar. Numerosos ejemplos de aves no voladoras soportan esta afirmación. Por tanto, se debe concluir que en Biología la generalidad es importante, pero también que no se debe despreciar la excepción. Excepción que, tal vez, cuando se amplíe nuestro conocimiento se acabe convirtiendo en regla. En Biología, en definitiva, el caso aislado puede jugar el papel clave. No debemos olvidarlo.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido elaborado gracias a la financiación recibida del MICINN a través el proyecto BFU2009-10185. Se agradecen también los acertados comentarios de los revisores y de la Dra. Mayte Villalba.

Referencias

- [1] E. Mayr *Por qué es única la Biología*, 2006, Katz Editores, Buenos Aires.
- [2] C.B. Anfinsen, E. Haber, *J. Biol. Chem.* **1961**, 36, 1361-1363.
- [3] C.B. Anfinsen, E. Haber, M. Sela, F.H. White Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, 47, 1309-1314.
- [4] D. Givol, R.F. Goldberger, C.B. Anfinsen, *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 3114-3116.
- [5] D. Givol, F. De Lorenzo, R.F. Goldberger, C.B. Anfinsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, 53, 676-684.
- [6] F.M. Richards, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, 162-166.
- [7] F.M. Richards, P.J. Vithayathil, *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 1459-1465.

- [8] D.J. States, C.M. Dobson, M. Karplus, T.E. Creighton, *Nature* **1980**, 286, 630-632.
- [9] G.D. Rose, T.P. Creamer, *Proteins* **1994**, 19, 1-3.
- [10] G.D. Rose, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 512-514.
- [11] S. Dalal, S. Balasubramanian, L. Regan, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 548-552.
- [12] S.I. Chan, *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, 38, 1-27.
- [13] Y. Lavner, D. Kotlar, *Gene* **2005**, 345, 127-138.
- [14] A.A. Komar, *Science* **2007**, 315, 466-467.
- [15] J.R. Coleman, D. Papamichail, S. Skiena, B. Fitcher, E. Wimmer, S. Mueller, *Science* **2008**, 320, 1784-1787.
- [16] C. Kimchi-Sarfaty, J.M. Oh, I.W. Kim, Z.E. Sauna, A.M. Calcagno, S.V. Ambudkar, M.M. Gottesman, *Science* **2007**, 315, 525-528.
- [17] M. Enserink, *Science* **2008**, 320, 1709.
- [18] J.L. Parmley, L.D. Hurst, *Bioessays* **2007**, 29, 515-519.
- [19] C.J. Tsai, Z.E. Sauna, C. Kimchi-Sarfaty, S.V. Ambudkar, M.M. Gottesman, R. Nussinov, *J. Mol. Biol.* **2008**, 383, 281-291.
- [20] T.M. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* **2009**, 461, 1234-1242.
- [21] F. Brandt, S.A. Etchells, J.O. Ortiz, A.H. Elcock, F.U. Hartl, W. Baumeister, *Cell* **2009**, 136, 261-271.
- [22] J. Gumbart, L.G. Trabuco, E. Schreiner, E. Villa, K. Schulten, *Structure* **2009**, 17, 1453-1464.
- [23] A. Kosolapov, C. Deutsch, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 405-411.
- [24] J.P. Ellis, P.H. Culviner, S. Cavagnero, *Protein Sci.* **2009**, 18, 2003-2015.
- [25] G. Kramer, D. Boehringer, N. Ban, B. Bukau, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 589-597.
- [26] G. Zhang, M. Hubalewska, Z. Ignatova, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, 16, 274-280.
- [27] I.J. Purvis, A.J. Bettany, T.C. Santiago, J.R. Coggins, K. Duncan, R. Eason, A.J. Brown, *J. Mol. Biol.* **1987** 193, 413-417.
- [28] C.H. Makhoul, E.N. Trifonov, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2002**, 20, 413-420.
- [29] T.A. Thanaraj, P. Argos, *Protein Sci.* **1996**, 5, 1973-1983.



A. Martínez del Pozo
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid
Tel: 913944259
Fax: 913944259
Correo electrónico: alvaro@bbm1.ucm.es
Recibido: XX/XX/2009. Aceptado XX/XX/2010